Aus dem Zentrallaboratorium und der Medizinal-
Untersuchungsstelle des Stadtkrankenhauses Offenbach
(Chefarzt: Priv. Doz. Dr. med. M. Kienholz)

Brauchbarkeit und Aussagewert bakteriologischer Untersuchungsmethoden für die Speiseeisüberwachung

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Reinhart Flux aus Siegen

Gießen 1970

Aus dem Zentrallaboratorium und der Medizinal-
Untersuchungsstelle des Stadtkrankenhauses
Offenbach
(Chefarzt: Priv.Doz.Dr.med.M.Kienholz)

- -

Brauchbarkeit und Aussagewert bakteriologischer Untersuchungsmethoden für die Speiseeisüberwachung

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Justus Liebig Universität Gießen

vorgelegt von
Reinhart Flux aus Siegen

Gießen 1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan:	Professor Dr. E. Habermann
Referent:	Priv.Doz.Dr. M. Kienholz
Korreferent:	Professor Dr. H.J. Wellensiek

Inhalt

1.	Einleitung	1
2.	Die Methodik der bakteriologischen Speiseeisuntersuchungen	4
2.1.	Untersuchungsmethoden anderer Autoren	4
2.1.1.	Aerobe Gesamtkeimzahl	4
2.1.2.	Der Nachweis von Escherichia coli	5
2.1.2.1.	Die Bestimmung der Colizahl	5
2.1.2.2.	Die Bestimmung des Colititers	5
2.1.2.3.	Die Membranfiltermethode	6
2.2.	Untersuchungen über die Brauchbarkeit anderer Methoden der bakteriologischen Speiseeisüberwachung	7
2.2.1.	Die Bestimmung des Colititers durch den Indolnachweis	7
2.2.1.1.	Methode	7
2.2.1.2.	Ergebnisse	8
2.2.2.	Die Bestimmung der Colizahl mit der Membranfiltermethode	8
2.2.2.1.	Methode	8
2.2.2.2.	Ergebnisse	9
2.3.	Eigene Untersuchungsmethoden	10
2.3.1.	Entnahme und Transport	10
2.3.2.	Die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl	10
2.3.3.	Die Bestimmung der Colizahl	12
2.4.	Diskussion der Methodik und der Ergebnisse der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung	13
3.	Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Bakterienarten und -Zahlen im Speiseeis bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und -Zeiten im Hinblick auf die Aussagekraft von Gegenproben bei der bakteriologischen Speiseeisbeurteilung	19
3.1.	Methode	19
3.1.1.	Versuch 1: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)	20
3.1.1.1.	Versuchsanordnung	20
3.1.1.2.	Versuchsergebnisse	21

3.1.2. Versuch 2: Das Verhalten von Streptococcus faecalis bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemp.) 21

3.1.2.1. Versuchsanordnung 21

3.1.2.2. Versuchsergebnisse 22

3.1.3. Versuch 3: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur) 22

3.1.3.1. Versuchsanordnung 22

3.1.3.2. Versuchsergebnisse 23

3.1.4. Versuch 4: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur) 23

3.1.4.1. Versuchsanordnung 23

3.1.4.2. Versuchsergebnisse 24

3.1.5. Versuch 5: Das Verhalten von Mischkulturen bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur) 24

3.1.5.1. Versuchsanordnung 24

3.1.5.2. Versuchsergebnisse 25

3.1.6. Versuch 6: Das Verhalten von Mischkulturen bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur) 26

3.1.6.1. Versuchsanordnung 26

3.1.6.2. Versuchsergebnisse 26

3.2. Diskussion der Ergebnisse 27

4. Zusammenfassung 30

5. Literatur 31

1. Einleitung

Immer wieder wird von Massenerkrankungen berichtet, die durch den Genuß von verdorbenem Speiseeis ausgelöst worden sind (W. B o e s e (5), W. B o r g m a n n (6), F r i t s c h (14), B o r n e f f (9), A d l e r (1) u.a.).

Der Speiseeiskonsum liegt bei 2,95 Liter pro Kopf in der Bundesrepublik gegenüber 25,75 Liter pro Kopf in den U.S.A. (1966). Es ist dabei mit einer starken Steigerung des Speiseeiskonsums in der Zukunft zu rechnen. Die zunehmende Wichtigkeit der damit verbundenen hygienischen Probleme ist nicht zu übersehen. W ü s t e n b e r g (zitiert nach B o r g m a n n (6)) bezeichnet die Untersuchung des Speiseeises im Augenblick als das "Problem Nr.1" des Hygienikers. Das wird auch deutlich, wenn A d l e r (1) von den Ergebnissen von 1953 berichtet, "daß also manches Speiseeis den Keimgehalt eines soliden Abwassers übertroffen hat".

Der Gesetzgeber versuchte der Problematik der Speiseeisherstellung und des Verkaufs von Speiseeis zunächst mit der Speiseeisverordnung vom 15.7.1933 gerecht zu werden. Diese enthielt aber im Wesentlichen nur eine Begriffsordnung der Speiseeissorten und lebensmittelchemische Anweisungen.

Da diese Speiseeisverordnung für die heutigen Belange nicht ausreichend ist, und bisher eine bundeseinheitliche Regelung nicht erfolgte, erließen die Länder auf dem Polizeiverwaltungsgesetz fußende Polizeiverordnungen. In Hessen ist zur Zeit die Polizeiverordnung über das hygienische Herstellen, Behandeln und Vertreiben von Speiseeis vom 8.8.1966 gültig. Sie legt die obere Grenze der aeroben Gesamtkeimzahl mit 150 000 Keimen pro Milliliter, die obere Grenze der Colizahl mit 10 Colibakterien pro Milliliter fest.

Auf die Unterschiedlichkeit der bakteriologischen Grundlagen der Speiseeisüberwachung in den einzelnen Bundesländern weist besonders W. B o r g m a n n (6) hin. Dieser

Unterschiedlichkeit müßte, wie schon von vielen Untersuchern gefordert, dringend durch eine bundeseinheitliche Regelung abgeholfen werden.

Sind schon die Bewertungsunterlagen bei der hygienischen Speiseeisüberwachung in den Ländern der Bundesrepublik verschieden, so ist über die dabei angewandten Untersuchungsmethoden zu sagen, daß es hierbei keinerlei Festlegung gibt. Die verschiedenen Methoden werden im nachfolgenden geschildert. W. B o e s e (5) wies jedoch bereits 1953 daraufhin, daß es für einen Vergleich der Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen Voraussetzung wäre, daß die Untersuchungsmethode festgelegt ist. Dies war der Anlaß unserer Untersuchung über die Brauchbarkeit der bakteriologischen Untersuchungsmethoden der Speiseeisüberwachung und zu der Beschreibung einer einfachen, der hygienischen Bedeutung jedoch Rechnung tragenden Methode der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung.

Die Bestimmungen des Lebensmittelgesetzes § 6, Absatz 1/2 über die Gegenprobe, erlauben es einem Speiseeishersteller, ein zur Beanstandung führendes Ergebnis einer Probeuntersuchung seines Speiseeises durch untersuchenlassen einer sogenannten Gegenprobe vor dem Gericht in Zweifel zu ziehen. Diese Gegenprobe wird gleichzeitig mit der untersuchten Probe entnommen und dem Speiseeishersteller versiegelt bis zur eventl. Untersuchung zur Aufbewahrung übergeben. Erfahrungsgemäß waren die bakteriologischen Untersuchungsergebnisse von Probe und Gegenprobe auch bei gleich erfahrenen Untersuchern, häufig sehr verschieden, was im Falle nicht zu beanstandender bakteriologischer Befunde der Gegenprobe vor Gericht zum Freispruch des Eisherstellers führte, auch wenn die zuerst untersuchte Speiseeisprobe zu beanstanden war.

Wir sahen uns deshalb veranlaßt, Untersuchungen über die Aussagekraft der Gegenprobe vorzunehmen.

Theoretisch ist es jedem Bakteriologen erklärlich, daß die Lagerung der versiegelten Gegenprobe bis zu deren even-

tueller Untersuchung je nach Zahl der enthaltenen Bakterien, deren Art, der Art des Speiseeises, der Lagerungstemperatur und der Lagerungszeit eine Veränderung der bakteriologischen Ergebnisse bewirkt. Da der Gesetzgeber aber bisher keine Regelung erließ, die eine Veränderung der bakteriologischen Befunde einer Gegenprobe vermeidet, stellten wir uns die Aufgabe, an Hand experimenteller Befunde die Veränderung der ursprünglichen Bakterienzahl je nach Art und Zahl der Bakterien sowie der Lagerungstemperatur und -Zeit nachzuweisen.

2. Die Methodik der bakteriologischen Speiseeisuntersuchungen

Bei der bakteriologischen Untersuchung des Speiseeises interessieren zwei Kriterien:
Die aerobe Gesamtkeimzahl und die Zahl von Escherichia coli als Indikator eventueller fäkaler Verunreinigung. Dementsprechend gibt es zwei Gruppen von Untersuchungsmethoden, und zwar die Bestimmung der Zahl aerob-wachsender Keime (= Gesamtkeimzahl) und die Bestimmung der Zahl von Escherichia coli.

2.1. Untersuchungsmethoden anderer Autoren

2.1.1. Aerobe Gesamtkeimzahl

Die geringsten methodischen Differenzen finden sich bei den Angaben über die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl. Sie erfolgt mit der Gußplattenmethode mit Nähragar und Nährgelatine. Die Speiseeisverdünnungen, mit welchen diese Gußplatten angelegt werden, unterscheiden sich jedoch bei den einzelnen Autoren stark, desgleichen die Verdünnungsmedien. H. S c h a d e (zitiert nach B o r n e f f (8)) geht z.B. von 1 ml bzw. 0,1 ml Speiseeis aus und verdünnt bis zu 1 : 100 000 in sterilem Leitungswasser. Auch O s t e r t a g (zitiert nach B o r n e f f (8)) benützt Verdünnungen von 1 : 10 000 und mehr in sterilem Leitungswasser oder steriler 0,9%iger Kochsalzlösung. K r u s e (zitiert nach B o r n e f f (8)) verdünnt bis zu 1 : 1000 und benützt dazu steriles Wasser. B o r n e f f (8) empfiehlt Verdünnungen bis zu 1 : 100 in 1%iger Peptonlösung. Die gleiche Verdünnungsstufe verwendet S e l e n k a (32), der jedoch Ringerlösung benützt. Differierende Angaben finden sich ferner über die Benützung von Nährböden, das Ausgießen derselben und vor allem über die Bebrütungsdauer und -Temperatur sowie über die Methode der Auszählung.

2.1.2. Der Nachweis von Escherichia coli

Beim Nachweis von Escherichia coli, wie bereits B o r n e f f (10) erwähnt, ergeben sich bei der Untersuchung auf den Gehalt des Speiseeises an Escherichia coli nicht nur methodische, sondern auch diagnostische Differenzen und Fehler.

2.1.2.1. Die Bestimmung der Colizahl

Bei der Bestimmung der Colizahl betreffen die differierenden Angaben sowohl die Art des Nährbodens, als auch die Art der Aussaat auf denselben. So empfiehlt R a u c h (zitiert nach B o r n e f f (8)) die Schichtgußmethode mit Endoagar, B o r n e f f (10) und S e l e n k a (32) die Verwendung von Hexachlorophen-Endoagar ebenfalls mit der Schichtgußmethode.

Wesentlich gravierender sind jedoch die Unterschiede in der Beurteilung der Kolonie von Escherichia coli. Sie reicht von der Annahme, daß Fuchsinglanz einer Kolonie auf dem Endonährboden gleichzusetzen ist mit der Diagnose Escherichia coli, bis zu den wissenschaftlichen Ausführungen B o r n e f f s (10) über dieses Thema.

2.1.2.2. Die Bestimmung des Colititers

Auch bei der Bestimmung des Colititers gibt es verschiedene Angaben über Nährboden, Methoden und Bewertung. Oft sogar stellt er die einzige Methode des Colinachweises dar, worauf bereits F r i t s c h (14) hinweist.

S c h a d e (zitiert nach B o r n e f f (8)) empfiehlt z.B. ein mit einem Durhamröhrchen versehenes Reagenzglas mit Galle-Gentianaviolett-Milchzucker-Peptonlösung zur Bestimmung des Colititers. K r u s e (zitiert nach B o r n e f f (8)) empfiehlt die Nährlösung nach B u l i r und Bebrütung bei 45°C. B o r n e f f (8) schlägt die im amerikanischen Einheitsverfahren zur Untersuchung von

Wasser und Abwasser beschriebene Galle-Pepton-Laktose-Brilliantgrünlösung vor, allerdings mit der Einschränkung, daß der Colititer sich keinesfalls für exakte Angaben eignet und nur zum Nachweis vereinzelter Colikeime verwendet werden kann. S e l e n k a (32) empfiehlt den gleichen Nährboden mit anschließender Subkultur auf Endoagar und folgender Colidiagnostik, wie sie bereits von B o r n e f f (8) gefordert wurde.

2.1.2.3. Die Membranfiltermethode

Die in der Wasseruntersuchung häufig benützte Membranfiltermethode wird auch zur Milchuntersuchung von W ü s t e n b e r g (zitiert nach B o r n e f f (8)) empfohlen, jedoch erwähnt B o r n e f f (8), daß ihm eine breite Anwendung auf diesem Gebiet nicht bekannt sei.

In den Membranfilterformationen Mi 115 empfiehlt die Sartorius Membranfilter GmbH die Filtration von Speiseeis zur Bestimmung von Colizahl und Gesamtkeimgehalt. Da uns aus persönlichen Mitteilungen die weite Verbreitung dieser Methode bei der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung bekannt ist, wurden von uns vergleichende Untersuchungen mit dem Plattenverfahren vorgenommen. Auf die mangelnde Colidiagnostik und die Bestimmung des Gesamtkeimgehaltes mit diesem Verfahren ist in der Diskussion eingegangen.

2.2. Untersuchungen über die Brauchbarkeit anderer Methoden der bakteriologischen Speiseeisüberwachung

2.2.1. Die Bestimmung des Colititers durch den Indolnachweis

2.2.1.1. Methode

Es wurden fünfzig Eisproben auf eine Colizahl eingestellt, die knapp über dem von der Hessischen Polizeiverordnung vom 8.8.1966 erlaubten Grenzwert lag, d.h. über 10 Colibakterien pro Milliliter Speiseeis. Das Einstellen des Speiseeises auf eine gewünschte Colizahl erfolgte durch Beimpfen der sterilen Eisproben aus einer Reinkultur von Escherichia coli. Gleichzeitig wurde eine Sterilitätskontrolle des unbeimpften Eises vorgenommen. Die Menge der Reinkultur von Escherichia coli, die zu der gewünschten Colizahl führte, wurde in ausführlichen Vorversuchen ermittelt. Nach dem Beimpfen der Eisproben wurde sehr gründlich durchgemischt. Die Homogenität der Bakterienverteilung nach dem Mischen wurde ebenfalls in umfangreichen Vorversuchen überprüft. Den auf die gewünschte Colizahl eingestellten Eisproben wurde jeweils zweimal ein Milliliter Speiseeis entnommen und dieses nach der unter 2.3.3. beschriebenen Methode auf Endoplatten ausgespatelt, 48 Stunden bebrütet und dann ausgezählt. Dies ergab die Kontroll-Colizahl. Von jeder der so kontrollierten Proben wurde 1 ml Eis unter sterilen Kautelen in ein Reagenzglas mit 10 ml Trypsinbouillon pipetiert und bei 37°C 48 Stunden lang bebrütet. Danach wurde die Indolreaktion durchgeführt, wie bei H a l l m a n n (15) beschrieben.

Weiter wurden von den ersten zehn eingestellten Eisproben jeweils 0,5 ml Eis entnommen und ebenfalls in Reagenzgläser mit 10 ml Trypsinbouillon pipetiert, diese wurden wie beschrieben bebrütet und mittels Indolnachweises geprüft.

2.2.1.2. Ergebnisse

Alle 50 Reagenzgläser mit 10 ml Trypsinbouillon, zu denen jeweils 1 ml der Eisproben hinzugegeben worden war, die sicher über 10 Colibakterien pro Milliliter enthielten, zeigten einen negativen Indolnachweis. Das gleiche Ergebnis fand sich bei jenen Reagenzgläsern mit Trypsinbouillon, denen nur 0,5 ml von den ersten zehn eingestellten Eisproben zugegeben worden war. Alle drei Kontrollen waren indolpositiv.

2.2.2. Die Bestimmung der Colizahl mit der Membranfiltermethode

2.2.2.1. Methode

Es wurden, wie schon unter 2.2.1.1. beschrieben, zehn Speiseeisproben mit Colizahlen knapp über 10 Coli pro ml Speiseeis eingestellt, da dies der erlaubte Grenzwert ist. Diese Eisproben wurden mit der unter 2.3.3. beschriebenen Methode mit zweimal je ein Milliliter Eis auf Endoplatten kontrolliert.

Aus den kontrollierten Eisproben wurde je 1 ml Speiseeis (für das Gerät Coli-5 nur 0,5 ml Speiseeis) in 10 ml 0,9%iger Kochsalzlösung gut gemischt und verdünnt, wie ebenfalls unter 2.3.3. beschrieben. Diese Eisverdünnung wurde mit dem Membran-Filterapparat PA 9 und Coli 5 mit den dafür empfohlenen Filtern unter sterilen Bedingungen filtriert. Da es sich um normales, häufig verwandtes Vanille-Speiseeis handelte, dauerte die vollständige Filtration im Apparat PA 9 bis zu 1 1/2 Stunden, im Gerät Coli 5 zwei Stunden und länger.

Die Bebrütung erfolgte auf Endonährböden, nachdem die Filter unter Vermeidung von Luftblasenbildung mit einer sterilen Pinzette aufgelegt worden waren. Die Bebrütungsdauer betrug 24 und 48 Stunden bei einer Bebrütungstemperatur von 37°C. Danach wurden die Kolonien ausgezählt.

2.2.2.2. Ergebnisse

Die Kontroll-Colizahl wurde durch Ausspateln von je 1 ml Speiseeis auf Endoplatten von 19 cm Durchmesser gewonnen. Bei Filtration der einzelnen Eisproben mit dem Gerät PA 9 und Coli 5 ergaben sich im Vergleich mit der Kontrolle folgende Colizahlen:

Colizahlkontrolle auf 19 cm Ø Endoplatte	Colizahl mit Gerät PA 9	Colizahl mit Gerät Coli 5
14 und 15	7	2
16 " 20	12	5
11 " 13	10	1
14 " 20	13	3
11 " 14	5	0
10 " 13	16	2
12 " 13	4	1
13 " 18	9	2
19 " 22	17	4
15 " 17	6	0

Die Kontrollfiltration der verwendeten sterilen Kochsalzlösung ergab kein Wachstum von Kulturen.

2.3. Eigene Untersuchungsmethoden

Wie aus dem unter 2.1. Gesagten hervorgeht, bestehen sehr große methodische Unterschiede bei den bakteriologischen Speiseeisuntersuchungen. Diese reichen von recht exakten, z.T. aber auch aufwendigen Verfahren bis zu kaum noch als bakteriologische Untersuchung anzuerkennenden Methoden. Deshalb haben wir uns die Aufgabe gestellt, eine möglichst einfache, leicht zu handhabende Methode der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung zu entwickeln. Diese Methode sollte trotzdem den strengen Kriterien gerecht werden, die wegen der eingangs erwähnten großen hygienischen Bedeutung der bakteriologischen Untersuchung des Speiseeises gefordert werden müssen. Wir möchten diese Methode im Nachfolgenden schildern.

2.3.1. Entnahme und Transport

Die Speiseeisprobe wird mit einem sterilen Stechkolben entnommen und in einem Thermosgefäß während des Transports vor dem Auftauen geschützt, am Untersuchungsort durch einen zehnminütigen Aufenthalt im Brutschrank aufgetaut. Es wird Wert darauf gelegt, daß zwischen Entnahme und Auftauen des Eises nicht mehr als zwei Stunden vergehen.

2.3.2. Die Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl

Unter sterilen Kautelen wird je ein Milliliter Speiseeis mit einer Pipette entnommen und es wird in steriler 0,9%iger Kochsalzlösung in drei Stufen 1 : 100, 1 : 1000 und 1 : 10 000 verdünnt. Die Entnahme von 0,1 ml Speiseeis als Untersuchungsmenge halten wir für zu ungenau. Auf eine gute Durchmischung des Speiseeises bei der Verdünnung ist sehr großer Wert zu legen, da davon die Genauigkeit des Ergebnisses abhängt. Die Durchmischung kann mit sterilen Glasperlen bei genügend langem Schütteln (10 Minuten) erfolgen. Besser wird sie jedoch mit einem sterilen Magnetrührer vorgenommen. Aus den Verdünnungsstufen 1 : 100,

1 : 1000 und 1 : 10 000 wird je 1 ml entnommenund in eine Plastik-Petrischale von 8,5 cm Durchmesser gegeben. Es wird 10 ml verflüssigter Nähragar II "Merck" in die Petrischale hinzugegeben und gut gemischt. Es ist auf sehr gutes Durchmischen zu achten, desgleichen auf waagerechte Auflage der Petrischale während des Erkaltens. Wir legen von jeder Verdünnungsstufe zwei Platten (Petrischalen mit 8,5 cm Durchmesser aus Plastik) mit Nähragar II "Merck" und eine mit Nährgelatine an. Außerdem muß natürlich eine Sterilitätskontrolle von Verdünnungsmedium und Nährböden erfolgen. Da bei dieser Zahl von Platten das Ergebnis nicht durch des Überschwärmen einer Petrischale gefährdet ist, haben wir auf das Schichtgußverfahren verzichtet. Die Platten werden dann nach dem Erstarren des Nährbodens genau betrachtet. Falls sie z.B. bei der Untersuchung von Fruchteis Partickel enthalten, die nach der Bebrütung mit Kolonien verwechselt werden könnten, werden diese Partickel ausgezählt und markiert. Dann werden die Agarplatten 48 Stunden lang bei 37°C bebrütet, die Gelatineplatten werden bei 22°C ebenfalls 48 Stunden bebrütet. Anschließend werden alle Platten ausgezählt. Auf die von B o r n e f f (8) ausführlich geschilderten häufig unterlaufenden Fehler beim Auszählen sei hier nochmals besonders hingewiesen. Wir legen Wert darauf, die Platten möglichst ganz auszuzählen. Deshalb wählen wir auch eine Verdünnung bis 1 : 10 000 (die allerdings wie erwähnt gut gemischt sein muß), denn es hat sich gezeigt, daß die Durchmischung der Eisverdünnung mit dem zugesetzten Nähragar in der Petrischale nicht immer homogen zu erreichen ist. Demzufolge würde eine Teilauszählung und die Multiplikation ihres Ergebnisses mit dem der ganzen Platte entsprechenden Faktor immer jenen Durchmischungsfehler in sich bergen. Die weitere Diagnostik der gewachsenen Keime erfolgt mikroskopisch und kulturell, um pathogene Keime auszuschließen. Daß pathogene Keime durchaus zu finden sind, wies W. B o e s e (5) schon 1953 nach. Wir unterstützen seine Forderung, daß diese Diagnostik nur vom Fachbakteriologen durchgeführt werden sollte.

2.3.3. Die Bestimmung der Colizahl

Unter sterilen Kautelen wird 1 ml Speiseeis aus dem Transportgefäß entnommen und auf je eine Endoplatte mit 19 cm Durchmesser gegeben. Diese Endoplatten müssen vorher gut getrocknet sein. Das Speiseeis wird mit einem sterilen Glasspatel von Triangelform gleichmäßig verteilt. Nach dem Vorschlag B o r n e f f s (8) kann man zum Speiseeis vor dem Ausspateln ein bis zwei Milliliter Nähragar hinzugeben, dann muß allerdings nochmals getrocknet werden.

Die Platte wird anschließend bei 37°C bebrütet und nach 24 und 48 Stunden ausgezählt. Treten Kolonien mit Rötung und Fuchsinglanz auf, so werden sie kulturell als Coli identifiziert. Diese Kolonien werden mikroskopisch im Grampräparat überprüft. Von den Kolonien gram-negativer Keime wird eine Reinkultur angelegt. Aus dieser Reinkultur wird die Colidiagnostik in der bunten Reihe fortgesetzt.

2.4. Diskussion der Methodik und der Ergebnisse der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung

Wie bereits B o r n e f f (8) und B o e s e (5) feststellten, wäre für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse der einzelnen bakteriologischen Speiseeisuntersuchungen Voraussetzung, daß die dabei angewandten Untersuchungsmethoden festgelegt sind.

Bereits bei der Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl finden sich gravierende Unterschiede in der Untersuchungsmethode der einzelnen Autoren und somit die Unmöglichkeit des Vergleichs der Untersuchungsergebnisse. Die sogenannten mikroskopischen Verfahren zur Bestimmung der Gesamtkeimzahl erübrigen wohl eine Diskussion, desgleichen die Membranfiltermethode in ihrer Anwendung zur Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl, obwohl sie von der Sartorius Membranfiltergesellschaft auch für diesen Zweck empfohlen wird.

Bei der am häufigsten verwendeten Gußplattenmethode differieren die Angaben der einzelnen Untersucher schon sehr bei der Festlegung der Probengröße, von der die Untersuchung auszugehen habe. Eine Ausgangsmenge von 0,1 ml Speiseeis, die einzelne Untersucher empfehlen, halten wir für nicht vertretbar. Es sei nochmals auf die von B o r n e f f (8) geschilderten Fehlermöglichkeiten hingewiesen.

Nach unseren Erfahrungen möchten wir eine Ausgangsmenge von einem Milliliter Speiseeis als kleinstmögliche Probengröße ansehen. Bei kleineren Proben addieren sich zu den von B o r n e f f (8) geschilderten Fehlern noch jene in erhöhtem Maße, die durch die Inhomogenität des Keimwachstums im Speiseeis bedingt sind.

Als Verdünnungsmedium ist destilliertes Wasser sicher nicht geeignet, wie schon H a r t m a n n (16) nachgewiesen hat. Wie viele Untersucher, verwenden wir sterile physiologische Kochsalzlösung zur Verdünnung. Wenn alle Untersucher diese als Medium verwenden würden, wäre sicher eine Ver-

gleichbarkeit der Ergebnisse in dieser Hinsicht erreicht. Nach den Untersuchungen von B o r n e f f (8) und H a r t m a n n (16) ist jedoch 1%ige bzw. 0,1%ige Peptonlösung der Kochsalzlösung vorzuziehen.

Bezüglich der Limitierung der Verdünnungsstufen auf vertretbare Grenzen stimmen wir B o r n e f f (8) zu. Er schreibt, daß bei den hohen Verdünnungen Fehlerwerte bis 100% auftreten und die so erhobenen Befunde keinesfalls die Verhängung von Strafen rechtfertigen.

Nach B o r n e f f (8) und F i s c h e r (zitiert nach B o r n e f f (8)) zeigen die höheren Verdünnungen in sterilem Leitungswasser oder Aqua.dest. geringere Keimzahlen als die Auswertung der Originallösung. Dies sei auf Plasmoptyse zurückzuführen und könne durch die Verwendung von 1% Peptonlösung vermieden werden.

H a r t m a n n (16) machte gegensätzliche Beobachtungen. Unterhalb des gut zählbaren Bereiches von 30 bis 300 Kolonien pro Platte, war bei ihm in der nächsten Verdünnungsstufe die Zahl der Kolonien nicht niedriger als erwartet, sondern höher. Wurde bei der Verdünnung von Keimzahlen zwischen 200 und 300 auf solche zwischen 20 und 30 zurückgegangen, fand er 14% mehr Keime als erwartet. Die Beobachtungen von B o r n e f f (8) und H a r t m a n n (16) bezüglich der höheren Verdünnungen sind gegensätzlich. Aus ihnen käßt sich wohl nur folgern, daß ein Befund von nur wenigen Keimen auf einer Zählplatte keinesfalls rechnerisch in eine Gesamtkeimzahl der Speiseeisprobe geschätzt werden sollte. Die von H a r t m a n n (16) als richtig angesehene Grenze von mindestens 30 Keimen pro Platte entspricht auch etwa den praktischen Erfahrungen, die wir mit der Keimzählmethode machten, sie ist jedenfalls eher zu niedrig als zu hoch. Die obere Grenze läßt sich aber, je nach Verwendung von Zählnetz und Lupe oder Mikroskop sicher höher als 300 Keime pro Platte ansetzen. Nach unseren Erfahrungen sollte jedoch nicht versucht werden, die Keimzahl in einer zu dicht bewachsenen Platte durch Auszählung nur weniger Gesichtsfelder zu bestimmen. Dafür ist die notwendige homo-

gene Durchmischung beim Ausgießen der Platte nicht gewährleistet. Die Genauigkeit ist dann in der nächsthöheren Verdünnung trotz des oben Gesagten sicher größer.

Die Verwendung des Schichtgußverfahrens bei der Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl ist sicher nützlich, aus Gründen der Einfachheit haben wir es jedoch nicht in unserer Routine benützt. Das Ausgießen der zweiten Schicht entspricht in seinem Arbeitsaufwand etwa dem des Anlegens der ersten Schicht. Wie schon unter 2.3.2. erwähnt, ist bei mehreren angelegten Platten in mehreren Verdünnungsstufen das Zählergebnis durch Überschwärmen einer oder zweier Platten nicht gefährdet.

Die von B o r n e f f (8) geforderte weitere Differenzierung der auf den Zählplatten gewachsenen Kolonien ist unbedingt notwendig.

B o e s e (5) kommt zu der gleichen Forderung. Er verbindet sie mit dem Hinweis, daß eine solche Differenzierung, wie natürlich auch jene bei der Colidiagnostik, nur von Fachbakteriologen durchgeführt werden kann.

Was die Bestimmung der Colizahl anlangt, möchten wir im wesentlichen den Ausführungen B o r n e f f s (10) folgen, speziell im Hinblick auf die Differenzierung. Mit Nachdruck möchten wir die Feststellung B o r n e f f s (10) unterstreichen:
"Von der Angabe einer 'genauen' Colizahl kann - solange nicht jede einzelne Kolonie untersucht wird - niemals die Rede sein".

Die Ergebnisse der experimentellen Untersuchung über die Brauchbarkeit des Indolnachweises zur Bestimmung des Colititers lassen keinen Zweifel zu. Sie bestätigen die Meinung B o r n e f f s (9), daß diese Methode für die Eisuntersuchung nicht brauchbar ist.

Unter 2.2.2. untersuchten wir die Brauchbarkeit der Membranfiltermethode zur Bestimmung der Colizahl. Im Vergleich mit dem von uns angewandten direkten Ausspateln

des Eises auf Endoplatten fand sich eine deutliche Unterlegenheit der Filtermethode. Die mit dieser Methode gefundenen Keimzahlen lagen meist wesentlich niedriger. Sie wiesen außerdem eine deutlich größere Schwankungsbreite auf. Dies gilt sowohl für die Befunde bei Verwendung des Gerätes PA 9 als auch des Gerätes Coli 5, bei dem die Ergebnisse noch unzuverlässiger waren. Die experimentellen Befunde zeigten mehrfach, daß ein Speiseeis mit einer Colizahl von mehr als 10 Coli pro Milliliter im Membranfilterverfahren weniger als diesen Grenzwert ergab. So wurden z.B. die Colizahlen bei der Kontrolle auf Endoplatten mit 15 und 17 Colibakterien pro ml Speiseeis festgestellt, bei der Filtration mit dem Gerät PA 9 ergab sich jedoch nur eine Colizahl von 6 pro ml Speiseeis. Dies führt bei der Anwendung dieses Verfahrens in der Praxis dazu, daß ein solches Speiseeis, das nach der Hessischen Polizeiverordnung vom 8.8.1966 zu beanstanden ist, unbeanstandet bleibt und die notwendigen hygienischen Konsequenzen nicht gezogen werden.

Die Filtergeräte waren in unseren Experimenten steril abgedeckt. Bei der Bebrütung der Filter stellten wir nur wenige Luftkeime fest. Dies ist bei breiter praktischer Anwendung sicher nicht zu garantieren, da nicht überall derartig umfangreiche Maßnahmen für steriles Arbeiten getroffen werden können. Eine weitere Gefährdung der notwendigen Sterilität bringt das nach der Sterilisation der Geräte notwendige Einlegen der Filter mit sich.

Ein Scheinargument zugunsten der Membranfiltermethode sei noch erwähnt. Wie wir aus persönlichen Mitteilungen wissen, halten einige Untersucher die Methode auch deshalb für besonders geeignet, weil sich das Ergebnis anhand der getrockneten und abgehefteten Filter mit den roten Flecken von Kolonien vor Gericht besser demonstrieren lasse. Dieses Argument ist ein Beweis dafür, daß eine weitere ausreichende Colidifferenzierung bei diesen Untersuchern nicht stattfindet.

Es sei nochmals B o r n e f f (8) zitiert: "..., denn für die gesundheitliche Beurteilung ist die Differenzierung wichtiger als die Feststellung der Zahl der Keime".

Nach unseren praktischen Erfahrungen ist das Membranfilterverfahren eine umständliche Untersuchungsmethode, verbunden mit der Gefahr der Unsterilität. Wegen der wesentlich schlechteren Ergebnisse im Vergleich mit dem direkten Ausspateln des Eises auf Endoplatten, halten wir die Membranfiltermethode nicht für geeignet, die Colizahl im Speiseeis exakt festzustellen.

Die von uns vorgeschlagene eigene Methode der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung wurde an zwei Zielen orientiert. Sie sollte so einfach wie möglich und so genau und zuverlässig wie nötig sein. Diese Zielsetzung bedeutet immer einen Kompromiß. Dieser darf verständlicherweise nur auf Kosten der Einfachheit, nie jedoch zu Lasten der Genauigkeit und Zuverlässigkeit gehen.

Aus Einfachheitsgründen haben wir deshalb auf das Schichtgußverfahren sowohl bei der Bestimmung der aeroben Gesamtkeimzahl als auch bei der Bestimmung der Colizahl verzichtet. Auf die weitere diagnostische Differenzierung der gewachsenen Keime auf der Zählplatte, darf jedoch aus Einfachheitsgründen nicht verzichtet werden. Dies geschieht leider noch oft. Nur durch diese Differenzierung lassen sich jedoch pathogene Keime feststellen und so die erwähnten Massenerkrankungen vermeiden.

Das Ausspateln von einem Milliliter Speiseeis auf eine Endoplatte von 19 cm Durchmesser zur Bestimmung der Colizahl halten wir ebenfalls für die einfachste Methode. Dabei sind die Fehlermöglichkeiten gering. Wir sind deshalb überzeugt, daß es die genaueste Möglichkeit zur Feststellung der Colizahl im Speiseeis ist. Wenn die Platten vorher gut getrocknet sind und jeweils mehrere Platten angelegt werden, halten wir aus Einfachheitsgründen das Schichtgußverfahren nicht für nötig, ohne dabei Konzessionen an die Genauigkeit der Ergebnisse zu machen. Bei der weiteren Klärung der Art

der gewachsenen Kolonien auf der Endoplatte darf wieder nur die Genauigkeit und Zuverlässigkeit der Diagnostik ein Ziel sein. Wir verweisen hier auf die Ausführungen von B o r n e f f (10) über die Colidifferenzierung. Keinesfalls darf zu Lasten der Genauigkeit eine einfachere Methode der Colidiagnostik gebraucht werden.

3. Untersuchungen über das Verhalten verschiedener Bakterienarten und -Zahlen im Speiseeis bei unterschiedlichen Lagerungstemperaturen und -Zeiten im Hinblick auf die Aussagekraft von Gegenproben bei der bakteriologischen Speiseeisbeurteilung

3.1. Methode

Wir verwandten als Speiseeis einen industriell hergestellten, häufig verwendeten Eismix. Nach Reinigung und Abflammen der Oberfläche der Eismixkonserven wurde das Speiseeis steril entnommen. Es wurde unter sterilen Bedingungen in Reagenzgläser abgefüllt. Es wurden stets Sterilitätskontrollen des so abgefüllten Eismixes vorgenommen. Zeigten diese kein Wachstum, so wurde der Eismix beimpft. Dazu verwandten wir Reinkulturen von Escherichia coli und Streptococcus faecalis bzw. ein Keimgemisch aus industriellem Speiseeispulver. Die zum Beimpfen nötige Menge der Reinkultur bzw. des Keimgemisches wurde in ausführlichen Vorversuchen ermittelt. Die Reagenzgläser mit Eismix wurden dann so eingestellt, daß sie eine gewünschte Keimzahl aus der Reinkultur bzw. dem Keimgemisch enthielten. Dies wurde schon unter 2.2.1.1. geschildert. Waren alle Reagenzgläser des Versuchs auf eine entsprechende Keimzahl eingestellt, so wurde diese Keimzahl kontrolliert. Dies geschah mit jeweils drei Keimzählplatten in drei (bzw. zwei) Verdünnungsstufen pro Reagenzglas. Die Kontrollen waren so ausführlich, um den in der Keimzählmethode bedingten Ungenauigkeitsfaktor so gering wie möglich zu halten. Neben den Zählplatten wurden Sterilitätskontrollen des Verdünnungsmediums angelegt. Das Auszählen der gewachsenen Kolonien erfolgte bis zu Keimzahlen von fünfhundert Keimen pro Platte mit bloßem Auge. Lagen die Keimzahlen darüber, wurden Lupe und Zählnetz verwandt. Bei Anwendung des Zählnetzes ging neben dem Verdünnungsfaktor auch der entsprechende Multiplikationsfaktor in das Ergebnis ein. Auf die von B o r n e f f (8) geschilderten Fehlermöglichkeiten bei der Keimzählmethode wurde bereits

eingangs hingewiesen. Die ermittelten Keimzahlwerte wurden als Ausgangskeimzahl für das entsprechend numerierte Reagenzglas notiert. Sie wurden der Keimzahl nach entsprechender Lagerung gegenübergestellt.

Nach der Entnahme der Kontrollproben für die Ausgangskeimzahl wurden die Reagenzgläser sofort in 3 Gruppen verteilt. Es wurde je eine Gruppe bei Temperaturen von -15°C, +4°C und Zimmertemperatur gelagert.

Nach 5, 10, 15 und 20 Tagen wurden je zwei Röhrchen dieser Gruppen ausgezählt. Dies geschah mit jeweils drei Keimzählplatten in zwei bzw. drei Verdünnungsstufen pro Reagenzglas. Der so gewonnene Keimzahlwert wurde der Ausgangskeimzahl des entsprechenden Röhrchens vor der Lagerung gegenübergestellt.

Es ergaben sich daraus die folgenden Tabellen. Diese zeigen die Veränderung der Keimzahlen im Speiseeis in Abhängigkeit von Keimart, Ausgangskeimzahl, Lagerungstemperatur und Lagerungszeit auf. Einzelheiten des jeweiligen Versuchs werden in einer Erläuterung zu jeder Tabelle im Folgenden dargestellt.

3.1.1. Versuch 1: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und 22°C (= Zimmertemperatur)

3.1.1.1. Versuchsanordnung

In den Reagenzgläsern 66 bis 89 wurde das Speiseeis mit Keimen einer Reinkultur von Escherichia coli auf die jeweils vermerkte Ausgangskeimzahl eingestellt. Die Keimzahlwerte wurden in tausend Keimen pro Milliliter Speiseeis angegeben. Nach einer Lagerungszeit von 5, 10, 15 und 20 Tagen wurde die Keimzahl des bei entsprechender Temperatur gelagerten Röhrchens erneut bestimmt. Alle Keimzahlenbestimmungen erfolgten dreifach (ausgehend von je 1 ml Speiseeis) in je 3 Verdünnungsstufen. Fand sich eine in der entsprechenden Verdünnung nicht feststellbare hohe Keimzahl, so wurde das

Tabelle 1: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

in tausend	+22°C (= Zimmertemperatur)						-15°C						+4°C					
	66			67			74			75			82			83		
Ausgangs-	2.240	2.688	2.408	2.800	2.464	2.800	2.374	3.080	3.690	4.480	3.546	4.010	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	1.700	2.130	2.350	2.750	2.450	3.000	2.750	3.160	2.130	3.850	3.720	3.260	75.480	106.400	84.000	52.200	50.000	54.000
	2.800	2.500	2.500	2.900	3.900	3.200	2.200	4.300	4.400	4.800	5.000	4.200	79.800	88.800	81.600	45.000	61.600	56.000
nach	x	x	x	x	x	x	616	784	784	231	240	210	5.600	7.200	7.300	8.430	8.500	8.680
5 Tagen	x	x	x	x	x	x	660	710	680	310	280	300	6.200	6.720	6.160	9.000	8.960	9.520
	358.400	336.000	400.000	392.000	336.000	324.800	800	1.200	500	500	200	200	6.900	9.000	6.300	10.000	9.400	10.700
	68			69			76			77			84			85		
Ausgangs-	1.938	1.900	1.680	5.158	6.460	5.824	3.157	2.576	2.880	4.480	5.000	5.600	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	2.800	2.800	3.360	3.700	3.200	3.140	2.970	2.290	2.280	4.800	5.600	3.360	39.200	19.040	26.320	106.400	95.200	84.000
	3.400	2.800	3.200	3.800	4.600	3.600	3.000	2.600	2.100	3.400	3.600	4.500	32.000	18.600	21.000	100.800	146.400	106.200
nach	x	x	x	x	x	x	560	672	580	280	278	225	672	728	730	1.400	1.360	1.344
10 Tagen	x	x	x	x	x	x	600	740	620	350	210	170	600	700	700	1.300	1.350	1.320
	422.200	383.000	509.600	409.100	433.400	378.600	700	1.000	1.000	300	300	500	1.200	1.200	700	2.100	2.200	2.000
	70			71			78			79			86			87		
Ausgangs-	2.688	2.240	2.520	2.250	2.240	2.016	9.072	7.560	10.080	3.864	4.592	4.256	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	2.410	2.730	2.660	1.800	2.530	2.160	8.790	7.540	8.720	5.600	4.970	5.430	128.800	140.000	141.120	116.480	184.800	202.160
	3.400	2.500	4.300	2.200	2.700	2.500	8.600	7.800	12.300	5.100	5.500	5.800	130.000	148.200	123.200	145.600	240.800	263.200
nach	x	x	x	x	x	x	188	156	177	217	193	194	784	1.008	952	100	60	260
15 Tagen	225.680	218.400	190.400	265.000	235.200	252.000	190	150	200	210	170	230	900	960	860	103	50	240
	224.000	257.600	184.800	308.000	224.000	268.000	300	200	200	200	200	200	800	1.100	1.000	100	100	200
	72			73			80			81			88			89		
Ausgangs-	6.832	6.280	13.060	23.400	19.900	20.100	6.384	7.064	6.830	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	7.450	9.900	13.570	25.200	20.890	14.210	5.880	6.620	6.610	56.000	41.440	64.840	82.320	118.800	85.800	156.800	106.400	130.000
	9.100	10.800	13.100	25.200	20.200	24.200	7.000	7.400	7.300	57.500	38.600	61.100	79.000	103.600	78.300	179.200	128.800	145.600
nach	x	x	x	x	x	x	195	243	212	100	82	79	112	103	117	187	122	118
20 Tagen	249.700	294.500	229.700	282.240	250.400	264.350	210	250	310	40	80	50	40	50	50	100	80	80
	257.600	351.900	348.300	347.000	292.000	339.400	300	100	200	x	x	x	x	x	x	x	x	x

mit einem X vermerkt. Nach entsprechender Lagerungszeit mußte höher verdünnt werden, um zählbare Ergebnisse zu erreichen.

3.1.1.2. Versuchsergebnisse (Tabelle 1)

Aus Tabelle 1 läßt sich zweifelsfrei ersehen, daß die Zahl an Escherichia coli im Speiseeis nach entsprechender Lagerungszeit bei Zimmertemperatur rasch sehr hohe Werte erreicht und auch weiterhin noch ansteigt. Bei einer Ausgangskeimzahl von 2 500 000 pro ml Speiseeis hat sie z.B. schon nach 5 Tagen Lagerungszeit die Zahl von 400 000 000 pro ml Speiseeis erreicht. Bei Lagerungstemperaturen von +4°C bzw. -15°C sank der Gehalt des Speiseeises an Escherichia coli stark ab. Bei +4°C fand sich z.B. nach einer Lagerungszeit von 20 Tagen eine Abnahme von 130 000 000 auf 80 000 Keime pro ml Speiseeis. Es sei bereits hier auf die Unterschiedlichkeit der Abnahme der Keimzahl hingewiesen, um jedem Versuch der Berechnung oder Schätzung der Keimzahlabnahme einer Gegenprobe in einem entsprechenden Falle entgegenzutreten.

3.1.2. Versuch 2: Das Verhalten von Streptococcus faecalis bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

3.1.2.1. Versuchsanordnung

Der Eismix in den Reagenzgläsern 90 bis 113 wurde aus einer Reinkultur von Streptococcus faecalis auf die jeweils vermerkte Ausgangskeimzahl eingestellt. Nach 5, 10, 15 und 20 Tagen wurde wieder die Entwicklung der Keimzahl nach einer Lagerung bei Zimmertemperatur, -15°C und +4°C bestimmt. Die Keimzahlkontrollen erfolgten ebenfalls dreifach und in je drei Verdünnungsstufen und wurden in tausend Keimen pro Milliliter Speiseeis angegeben.

3.1.2.2. Versuchsergebnisse (Tabelle 2)

Wieder zeigt sich bei der Lagerung bei Zimmertemperatur eine starke Zunahme der Keimzahl. Sie nimmt z.B. schon nach fünf Tagen Lagerungszeit von 188 800 000 auf 728 000 000 Keime pro ml Speiseeis zu.

Im Gegensatz zu den Versuchsergebnissen von Tabelle 1, mit Escherichia coli, findet sich jedoch ein deutlicher Unterschied der Keimzahlveränderungen zwischen der Lagerung bei -15°C und +4°C. Bei -15°C findet sich z.B. nach einer Lagerung von 5 Tagen nur eine Keimzahlzunahme von 2 100 000 auf 2 600 000 Keime pro ml Speiseeis. Bei einer Lagerungstemperatur von +4°C jedoch zeigt sich nach der gleichen Lagerungszeit eine Zunahme von z.B. 26 700 000 auf 201 600 000 Keime pro ml Speiseeis. Auf die Bedeutung dieser unterschiedlichen Lagerungstemperaturempfindlichkeit wird in der Diskussion eingegangen.

3.1.3. Versuch 3: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und + 22°C (= Zimmertemperatur)

3.1.3.1. Versuchsanordnung

Die Reagenzgläser mit Eismix der Nummern 132 bis 161 wurden wieder aus einer Reinkultur von Escherichia coli beimpft. Sie wurden jedoch auf eine knapp über der Grenze des Erlaubten liegende Zahl von E.coli je Milliliter eingestellt.

Die Ausgangskeimzahl wurde mit Endoplatten von 19 cm Durchmesser nach der unter 2.3.3. von uns vorgeschlagenen Methode bestimmt. In der Tabelle sind die Keimzahlen pro ml Speiseeis angegeben. Die Keimzahlveränderungen nach entsprechender Lagerungszeit lassen sich jedoch nicht bei allen drei verschiedenen Lagerungstemperaturen mit der gleichen für die Ausgangskeimzahl verwandten Methode feststellen. Diese war vielmehr nur für die Feststellung der Ergebnisse nach Lagerung bei -15°C und +4°C verwendbar. Die Keimzahlergebnisse nach Lagerung bei Zimmertemperatur sollten mit

Tabelle 2: Das Verhalten von Streptococcus faecalis bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

in tausend	+22°C (= Zimmertemperatur)						-15°C						+4°C					
	90			91			98			99			106			107		
Ausgangs-	x	x	x	x	x	x	1.460	1.456	1.400	1.176	1.344	1.288	20.720	42.000	21.112	26.300	27.800	25.200
Keimzahl	100.800	72.880	92.400	161.000	168.000	156.800	1.560	1.440	1.520	1.600	1.370	1.450	22.500	30.800	22.400	25.200	28.000	29.120
	188.800	84.000	89.600	155.800	151.200	158.200	1.500	2.000	2.000	2.100	1.700	2.400	30.000	42.000	26.000	26.700	37.500	29.700
nach	x	x	x	x	x	x	1.670	1.736	1.792	1.800	1.736	1.680	x	x	x	x	x	x
5 Tagen	x	x	x	x	x	x	1.600	1.540	1.530	1.630	1.900	2.200	142.800	185.000	151.200	163.000	150.000	156.800
	728.000	560.000	616.000	620.000	730.000	700.000	1.800	2.500	2.400	2.600	2.200	2.100	184.800	212.000	128.800	201.600	190.400	161.000
	92			93			100			101			108			109		
Ausgangs-	x	x	x	x	x	x	3.360	2.688	2.800	3.360	2.800	2.968	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	76.720	95.760	98.000	114.860	92.400	116.480	3.200	2.910	2.970	3.340	2.660	3.660	29.680	28.000	29.460	72.800	75.600	67.200
	117.600	121.000	122.100	100.800	123.200	104.600	4.600	3.800	3.000	4.200	4.600	4.000	40.400	36.900	39.600	78.400	72.800	84.000
nach	x	x	x	x	x	x	5.760	5.824	5.500	5.152	5.040	4.550	x	x	x	x	x	x
10 Tagen	x	x	x	x	x	x	6.720	6.500	6.160	5.040	6.160	5.600	149.520	160.720	150.080	170.240	171.960	191.520
	634.500	600.300	603.700	756.000	604.000	716.800	6.100	7.500	6.000	6.800	7.300	6.200	198.200	201.600	183.700	179.200	210.600	201.600
	94			95			102			103			110			111		
Ausgangs-	x	x	x	x	x	x	4.200	3.920	4.200	7.840	8.000	8.176	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	175.000	168.000	190.000	140.000	117.600	112.000	4.350	3.940	4.000	6.720	9.530	9.520	95.200	91.840	102.480	83.440	93.520	82.880
	190.400	188.000	197.000	151.200	134.400	113.200	5.000	4.400	4.100	8.200	9.600	10.400	117.600	95.200	123.200	106.800	88.500	84.000
nach	x	x	x	x	x	x	4.760	5.600	5.400	17.300	15.600	13.400	x	x	x	x	x	x
15 Tagen	x	x	x	x	x	x	6.160	5.750	5.600	16.800	15.120	14.560	164.100	190.400	183.000	189.900	173.100	194.300
	644.000	761.600	627.500	683.200	535.000	537.000	6.700	8.400	8.000	20.000	17.700	18.500	220.000	205.000	212.000	235.200	204.000	215.000
	96			97			104			105			112			113		
Ausgangs-	x	x	x	x	x	x	8.960	8.400	8.200	7.840	8.400	7.448	x	x	x	x	x	x
Keimzahl	130.520	123.760	148.400	113.500	112.000	123.400	9.740	9.520	7.280	8.703	9.520	8.960	147.280	130.480	159.600	108.300	92.960	116.480
	145.600	123.200	190.400	123.200	117.000	168.000	8.800	11.400	8.900	8.500	11.000	10.200	179.200	151.200	134.400	134.400	117.600	123.200
nach	x	x	x	x	x	x	12.180	10.980	9.870	10.080	13.104	12.992	x	x	x	x	x	x
20 Tagen	x	x	x	x	x	x	14.850	12.450	11.550	12.320	15.680	12.880	216.000	224.000	230.000	201.600	232.400	184.800
	728.000	570.800	560.000	761.600	695.000	684.000	19.500	14.000	13.500	12.500	12.000	16.000	252.000	229.000	280.000	257.600	224.000	226.000

der unter 2.3.2. geschilderten Methode bestimmt werden, wie sie auch schon für die Versuche 1 und 2 verwendet wurde.

3.1.3.2. Versuchsergebnisse (Tabelle 3)

Die Keimzahlentwicklung nach Lagerung bei Zimmertemperatur übertraf unsere Erwartungen und die Ergebnisse der Vorversuche. Sie konnte in den angegebenen Verdünnungsstufen nicht mehr ausgezählt werden. Die exakte Zahl wäre aber wohl nur von theoretischem Interesse, da sie die Grenze des Erlaubten schon nach kurzer Lagerungszeit um mehr als das Hundertfache überschreitet.

Interessanter sind die Keimzahlentwicklungen bei den Lagerungstemperaturen von -15°C und +4°C. Die meistgewählte Lagerungstemperatur für eine Gegenprobe liegt bei +4°C. Wie aus Tabelle 3 ersichtlich, weisen die Keimzahlen gerade aber bei dieser Temperatur im Laufe ihrer Lagerung beachtliche Unterschiede auf.

Bei einer Lagerungstemperatur von -15°C zeigt sich gleichfalls eine sehr interessante Entwicklung. Nach entsprechender Lagerungszeit von z.B. 15 Tagen nimmt die Ausgangskeimzahl von 27 Keimen pro ml auf eine Keimzahl von 4 bzw. 5 Keimen pro ml ab. Von einem Wert weit über der erlaubten Keimzahl erreicht sie somit einen solchen, der innerhalb der gestatteten Colizahl liegt. Auf die Entwicklung in den erlaubten Colizahlbereich hinein bei entsprechender Lagerungstemperatur und -Zeit sei hier besonders hingewiesen. Die Konsequenzen werden in der Diskussion erläutert.

3.1.4. Versuch 4: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

3.1.4.1. Versuchsanordnung

In Versuch vier wurden, wie im vorangegangenen Versuch, Reagenzgläser verwandt, die mit einer Reinkultur von Escherichia coli eingestellt wurden. Die Keimzahlangabe erfolgte

wieder in Escherichia coli je Milliliter Speiseeis. Die Reagenzgläser wurden auf eine Ausgangskeimzahl von etwa 80 Keimen pro Milliliter eingestellt. Dies sollte ermöglichen, die Keimzahlentwicklung in erlaubte Bereiche hinein bei Lagerungstemperaturen von +4°C und -15°C noch deutlicher zu veranschaulichen.

3.1.4.2. Versuchsergebnisse (Tabelle 4)

In Reagenzglas Nr.165 erfolgte eine Entwicklung von 80 Colibakterien pro ml in erlaubte Bereiche hinein, und zwar schon nach zehn Tagen. Die Ausgangskeimzahlen des Versuchs Nr.3 lagen knapp über der Grenze der erlaubten Colizahl. Eine Entwicklung in erlaubte Colizahlen hinein nach entsprechender Lagerung, ließ sich bei jenem Versuch eventuell noch bagatellisieren. Bei diesem Versuch erfolgte eine Keimzahlentwicklung von 80 Colibakterien pro Milliliter Speiseeis bis in die erlaubte Colizahl hinein. Dies ist sicher eine eindeutige Aussage.

Die unterschiedliche Keimzahlzunahme bei Lagerung bei Zimmertemperatur unterstreicht die Erfahrung, daß eine Berechnung dieser Entwicklung bei bekannter Lagerungszeit und -Temperatur nicht möglich ist. Darauf wurde schon bei der Besprechung der Keimzahlabnahme in Versuch 1 hingewiesen.

3.1.5. Versuch 5: Das Verhalten von Mischkulturen bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

3.1.5.1. Versuchsanordnung

Bei Versuch 5 wurde keine Reinkultur zur Beimpfung der Reagenzgläser benutzt. Im Gegensatz zu dem bisher erläuterten Verfahren wurde eine Mischkultur verwandt. Diese züchteten wir aus einem industriell hergestellten und häufig verwendeten Eispulver. Wie die bisherigen Versuche zeigten, verhalten sich die verschiedenen Keime bei verschiedenen Lagerungstemperaturen und -Zeiten unterschiedlich. Aus diesem Grunde entschlossen wir uns, auch das Verhalten von

Tab.3: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

	+22°C (= Zimmertemperatur)		-15°C		+4°C	
Ausgangs-Keimzahl	Nr.152 35 K/ml	Nr.153 23 K/ml	Nr.132 32 K/ml	Nr.133 29 K/ml	Nr.142 22 K/ml	Nr.143 37 K/ml
nach 5 Tagen	1 : 100 nicht zählb.	1 : 100 nicht zählb.	22 K/ml	15 K/ml	109 K/ml	63 K/ml
Ausgangs-keimzahl	Nr.154 18 K/ml	Nr.155 23 K/ml	Nr.134 24 K/ml	Nr.135 34 K/ml	Nr.144 37 K/ml	Nr.145 19 K/ml
nach 10 Tagen	1 : 1000 nicht zählb.	1 : 1000 nicht zählb.	11 20 K/ml	12 13 K/ml	110 106 K/ml	61 55 K/ml
Ausgangs-Keimzahl	Nr.156 30 K/ml	Nr.157 25 K/ml	Nr.136 24 K/ml	Nr.137 27 K/ml	Nr.146 34 K/ml	Nr.147 36 K/ml
nach 15 Tagen	1 : 10 000 nicht zählb.	1 : 10 000 nicht zählb.	9 14 K/ml	4 5 K/ml	308 177 K/ml	65 78 K/ml
Ausgangs-Keimzahl	Nr.158 36 K/ml	Nr.159 34 K/ml	Nr.138 34 K/ml	Nr.139 20 K/ml	Nr.148 25 K/ml	Nr.149 29 K/ml
nach 20 Tagen	1 : 100 000 1 : 1000000 nicht zählb.	1 : 100 000 1 : 1000000 nicht zählb.	7 3 K/ml	8 7 K/ml	158 114 K/ml	42 52 K/ml

Tab.4: Das Verhalten von Escherichia coli bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

	+22°C (= Zimmertemperatur)		-15°C		+4°C	
Ausgangs-Keimzahl	Nr.182 87 K/ml	Nr.183 85 K/ml	Nr.162 82 K/ml	Nr.163 55 K/ml	Nr.172 114 K/ml	Nr.173 79 K/ml
nach 5 Tagen	1 : 1000 nicht zählb.	1 : 1000 nicht zählb.	45 43 K/ml	37 31 K/ml	81 63 K/ml	96 80 K/ml
Ausgangs-Keimzahl	Nr.184 81 K/ml	Nr.185 84 K/ml	Nr.164 84 K/ml	Nr.165 80 K/ml	Nr.174 99 K/ml	Nr.175 72 K/ml
nach 10 Tagen	95 200 000 128 800 000	134 400 000 168 000 000	18 20 K/ml	14 10 K/ml	51 48 K/ml	57 62 K/ml
Ausgangs-Keimzahl	Nr.186 84 K/ml	Nr.187 75 K/ml	Nr.166 87 K/ml	Nr.167 67 K/ml	Nr.176 91 K/ml	Nr.177 84 K/ml
nach 15 Tagen	300 000 000 271 000 000	732 400 000 784 000 000	6 13 K/ml	10 16 K/ml	41 31 K/ml	49 51 K/ml
Ausgangs-Keimzahl	Nr.188 79 K/ml	Nr.189 68 K/ml	Nr.168 76 K/ml	Nr.169 88 K/ml	Nr.178 99 K/ml	Nr.179 72 K/ml
nach 20 Tagen	67 200 000 70 000 000	89 600 000 90 000 000	13 4 K/ml	10 9 K/ml	17 6 K/ml	12 16 K/ml

Tabelle 5: Das Verhalten von Mischkulturen bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

in tausend	+22°C (= Zimmertemperatur)						-15°C						+4°C					
	208			209			192			193			200			201		
Ausgangs-	111	101	125	168	123	156	151	146	123	151	145	151	162	140	151	146	129	112
Keimzahl	148	172	146	175	180	182	156	150	114	164	158	175	160	153	170	186	128	168
nach	x	x	x	x	x	x	207	172	190	170	190	168	1.100	1.064	952	263	224	207
5 Tagen	381.400	389.600	370.000	401.000	324.000	384.200	227	216	226	194	200	224	920	1.120	1.288	248	234	244
	210			211			194			195			202			203		
Ausgangs-	140	123	162	140	156	123	135	118	134	114	106	112	146	134	156	146	140	145
Keimzahl	152	180	173	200	188	191	176	155	160	140	143	146	152	164	170	162	155	162
nach	x	x	x	x	x	x	224	213	212	157	145	156	1.438	1.344	1.304	1.480	1.792	1.400
10 Tagen	425.600	364.000	570.000	408.800	400.200	487.200	250	214	205	154	176	171	1.568	1.624	1.400	1.568	1.780	1.456
	212			213			196			197			204			205		
Ausgangs-	168	123	157	168	162	174	135	129	123	170	168	145	106	101	118	156	146	140
Keimzahl	205	202	194	200	185	190	169	155	150	190	181	163	190	148	157	180	147	141
nach	x	x	x	x	x	x	146	157	123	176	179	151	x	x	x	1.120	695	749
15 Tagen	456.300	508.500	341.600	487.200	400.000	509.600	160	167	164	204	221	170	2.576	2.296	2.240	1.126	728	896
	214			215			198			199			206			207		
Ausgangs-	186	171	182	151	134	162	140	123	151	148	150	146	151	138	140	130	140	134
Keimzahl	164	185	161	183	184	193	150	166	185	182	152	175	155	180	143	154	158	150
nach	x	x	x	x	x	x	168	148	145	179	162	134	x	x	x	1.400	1.238	1.069
20 Tagen	532.000	448.000	644.000	540.000	454.000	532.000	161	129	158	174	132	183	9.296	8.792	7.236	1.288	1.680	1.064

Mischkulturen in Beziehung auf Lagerungstemperatur und -Zeit zu prüfen. Der Gedanke lag nahe, zunächst die beiden verwendeten Reinkulturen zu mischen und dann deren weiteres Verhalten nach verschiedener Lagerungszeit und -Temperatur zu untersuchen. Um jedoch möglichst praxisnahe Ergebnisse zu erzielen, verwandten wir Mischkulturen aus häufig gebrauchtem Eispulver. Es läßt sich somit nicht mehr der Einwand erheben, die Versuche seien nur mit Reinkulturen und unter künstlichen Bedingungen durchgeführt. Vielmehr entsprechen die Umstände der Versuche 5 und 6 durchaus jenen, die bei der Ziehung von Probe und Gegenprobe in der Praxis herrschen.

Die Methodik betreffend sei noch darauf hingewiesen, daß die Auszählung in jeweils zwei Verdünnungsstufen erfolgte. Die Ergebnisse wurden in tausend Keimen pro Milliliter Speiseeis angegeben. Mit einem Keimgemisch ist natürlich die exakte Einstellung auf eine gewünschte Ausgangskeimzahl schwieriger als mit einer Reinkultur. So waren für die Versuche 5 und 6 auch langwierigere Vorversuche notwendig.

3.1.5.2. Versuchsergebnisse (Tabelle 5)

Als Ergebnis zeigte sich wieder eine schnelle und starke Keimzahlzunahme bei Lagerung bei Zimmertemperatur. Bei -15°C Lagerungstemperatur erfolgte keine gravierende Keimzahländerung (vergleiche Keimzahlentwicklung in diesem Temperaturbereich in Versuch 3 und 4). Bei +4°C Lagerungstemperatur ergab sich wieder eine unterschiedliche Zunahme der Keimzahl. Es wurde bereits darauf hingewiesen, daß +4°C wohl die häufigste Lagerungstemperatur ist.

3.1.6. Versuch 6: Das Verhalten von Mischkulturen bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

3.1.6.1. Versuchsanordnung

Die Reagenzgläser mit Eismix dieses Versuches wurden, wie bereits unter 3.1.5.1. beschrieben, mit Keimen aus einer Mischkultur beimpft. Diese stammte ebenfalls aus einem häufig verwandten industriell hergestellten Eispulver. Die Keimzahlbestimmung erfolgte ebenfalls in zwei Verdünnungsstufen. Bei der Ausgangskeimzahl waren dies die Verdünnungen 1 : 100 und 1 : 1000. Bei Lagerung bei Zimmertemperatur mußten diese Verdünnungsstufen entsprechend der Keimzahlentwicklung erhöht werden. Bei -15°C Lagerungstemperatur konnten sie, wie bei der Bestimmung der Ausgangskeimzahl, beibehalten werden. Bei Lagerung bei +4°C mußte nur nach einer Lagerungsdauer von 20 Tagen eine Stufe höher verdünnt werden, um einwandfrei zählbare Ergebnisse zu bekommen.

3.1.6.2. Versuchsergebnisse (Tabelle 6)

Die Keimzahlentwicklung in diesem Versuch ist gegenüber der von Versuch 5 noch etwas deutlicher. Die Keimzahlzunahme bei Lagerung bei Zimmertemperatur und bei +4°C ist noch größer. Sie ist sicher durch die erhöhte Ausgangskeimzahl bedingt. Bei einer Lagerungstemperatur von -15°C ergab sich wieder keine starke Änderung, obwohl eine leichte Keimzahlzunahme nach entsprechender Lagerungszeit auch hier zu verzeichnen ist.

Tabelle 6: Das Verhalten von Mischkulturen bei Lagerungstemperaturen von -15°C, +4°C und +22°C (= Zimmertemperatur)

in tausend	+22°C (= Zimmertemperatur						-15°C						+4°C					
	232			233			216			217			224			225		
Ausgangs-	605	600	476	504	674	506	340	332	336	450	448	450	370	380	409	409	420	352
Keimzahl	580	616	560	672	678	616	504	560	616	504	616	560	445	450	448	448	560	336
nach	x	x	x	x	x	x	560	437	532	560	510	588	x	x	x	x	x	x
5 Tagen	789.600	728.000	784.000	644.000	560.000	576.800	672	616	616	562	568	560	4.480	4.648	4.032	4.000	5.096	5.600
	234			235			218			219			226			227		
Ausgangs-	588	494	638	470	616	431	564	580	672	450	476	400	370	437	400	448	420	353
Keimzahl	700	672	618	472	620	504	560	504	616	560	672	616	520	500	504	500	504	672
nach	672.000	560.000	728.000	560.000	500.000	504.000	560	506	568	504	560	560	x	x	x	x	x	x
10 Tagen	896.000	784.000	730.000	728.000	896.000	840.000	564	672	560	560	840	672	12.880	11.200	12.320	18.400	19.600	16.800
	236			237			220			221			228			229		
Ausgangs-	504	448	612	580	717	672	392	448	392	560	448	472	392	336	392	476	476	504
Keimzahl	616	618	560	672	674	784	672	616	672	672	616	560	448	616	504	448	616	560
nach	504.000	476.000	588.000	577.000	672.000	638.000	476	504	504	560	588	560	x	x	x	x	x	x
15 Tagen	672.000	616.000	504.000	788.000	952.000	896.000	672	672	504	728	672	616	30.000	35.280	40.000	48.000	42.000	56.000
	238			239			222			223			230			231		
Ausgangs-	616	588	700	620	616	600	476	448	392	336	375	364	400	454	403	448	540	460
Keimzahl	784	728	672	680	672	504	504	616	560	500	448	504	620	500	616	784	660	672
nach	1344.000	900.000	728.000	448.000	300.000	300.000	665	560	728	560	540	538	x	x	x	x	x	x
20 Tagen	1120.000	896.000	784.000	560.000	504.000	400.000	680	620	672	616	672	560	106.400	100.800	93.520	123.200	95.200	112.000

W
e
e
v
c
V
t
K
k
k
r
v
k

(
1
1
]
.
:

3.2. Diskussion der Ergebnisse

Wir untersuchten das Verhalten verschiedener Bakterienarten und -Zahlen im Speiseeis bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur und -Zeit. Diese Untersuchungen wurden zur Beurteilung der Aussagekraft von Gegenproben bei der hygienischen Speiseeisüberwachung durchgeführt. Eine Gegenprobe wird versiegelt dem Eishersteller zur Aufbewahrung bis zu einer eventuellen Kontrolluntersuchung übergeben. Unsere Versuchsergebnisse zeigen, daß eine Gegenprobe bei einer Nachuntersuchung je nach Keimart und Ausgangskeimzahl, Lagerungstemperatur und -Zeit differierende Ergebnisse erwarten läßt.

Die Ergebnisse von Versuch 1 und 2 zeigen, daß bei unterschiedlichen Keimarten eine differierende Entwicklung bei verschiedenen Lagerungstemperaturen nachzuweisen ist. Bei einer Lagerungstemperatur von -15°C und einer Lagerungszeit von nur 5 Tagen bei Reagenzglas Nr.75 (Escherichia coli) zeigt sich z.B. eine Keimzahlabnahme von 5000 auf 200 Keime pro ml. In Versuch 2 zeigt Reagenzglas Nr.99 (Streptococcus faecalis) bei gleicher Lagerungstemperatur und -Zeit nicht eine Abnahme der Ausgangskeimzahl, sondern eine geringe Zunahme von 2 100 auf 2 600. Bei der Erläuterung der Versuchsergebnisse von Versuch 1 wurde bereits darauf hingewiesen, daß selbst bei der gleichen Keimart eine unterschiedliche Keimzahlabnahme, oder Zunahme, wie im Versuch Nr.4 gezeigt, erfolgen kann.

Die Ergebnisse von Versuch 5 und 6 zeigen, daß Mischkulturen verschiedener Speiseeiskeime ebenfalls unterschiedliche Keimzahlen nach entsprechender Lagerungszeit ergeben. Bei Lagerungstemperaturen von +4°C und Lagerungszeiten von 10 Tagen zeigt Reagenzglas Nr.202 eine Keimzahlzunahme von 152 auf 1 568. Dagegen ergibt sich bei Reagenzglas Nr.226 mit einer anderen Mischkultur bei gleicher Lagerungstemperatur und -Zeit eine Keimzahlzunahme von 520 auf 12 880 Keime pro ml. Da im Speiseeis meist Misch-

kulturen vorkommen, sind schon aus diesem Grunde bei der Untersuchung einer Gegenprobe ganz verschiedene Ergebnisse nach unterschiedlicher Lagerungszeit und -Temperatur zu erwarten.

Der Einfluß einer unterschiedlichen Ausgangskeimzahl auf die Keimzahlergebnisse nach einer entsprechenden Lagerungszeit und -Temperatur zeigt sich besonders deutlich im Vergleich der Ergebnisse von Versuch Nr.3 und 4. Auch im Vergleich der Ergebnisse von Versuch Nr.5 und 6 zeigt sich dieser Einfluß deutlich. Bei einer Lagerungstemperatur von $-15^{o}C$ und einer Lagerungszeit von 10 Tagen ergibt sich z.B. in Reagenzglas Nr.135 (Escherichia coli) nur eine Keimzahlabnahme von 34 Keimen auf 12 bzw. 13 Keime. Dagegen zeigt Reagenzglas Nr.165 (Escherichia coli) bei gleicher Lagerungstemperatur und -Zeit eine Keimzahlabnahme von 80 Keimen auf 14 bzw. 10 Keime. Dies bedeutet, daß die Keimzahlabnahme in einem prozentualen Verhältnis erfolgt.

Aus diesen Versuchsergebnissen muß geschlossen werden, daß die Untersuchung einer Gegenprobe bei einem zweiten Untersucher nur gleichzeitig mit der Erstuntersuchung erfolgen darf, nachdem sie vom amtlichen Beauftragten entnommen und unter den oben geschilderten Vorsichtsmaßnahmen direkt zum Untersucher gebracht wurde. Jegliche Lagerung einer Gegenprobe kann eine Veränderung der aeroben Gesamtkeimzahl sowie der Colizahl zur Folge haben. Oft geben die bakteriologischen Befunde der Erstuntersuchung Anlaß zur Beanstandung. Erst nach der Beanstandung wird dann die Gegenprobe von einem Zweituntersucher auf ihren Keimgehalt geprüft. Die von uns festgestellte Beeinflussung des Keimgehalts je nach Ausgangskeimzahl, Keimart, Lagerungstemperatur und -Zeit beweist jedoch, daß das Ergebnis einer Gegenprobe keinen Aussagewert besitzt, wenn sie nicht zur gleichen Zeit und mit denselben Methoden wie die Hauptprobe untersucht wurde. Dies gilt insbesondere auch dann, wenn die in der Gegenprobe festgestellte Keimzahl erlaubte Werte zeigt. Wie Versuch Nr.4 illustriert, ist eine Entwicklung der Keimzahl von Escherichia coli in erlaubte Bereiche

nach entsprechender Lagerungszeit und -Temperatur durchaus möglich. Reagenzglas Nr.165 ergibt nach einer Lagerungszeit von 10 Tagen bei -15°C eine Keimzahlabnahme von 80 Keimen pro ml auf 10 Keime bzw. 14 Keime pro ml und erreicht damit die Grenze des Erlaubten.

Die ursprüngliche Keimzahl eines Speiseeises, das erst nach einer gewissen Lagerungszeit bei einer bestimmten Temperatur untersucht wurde, rechnerisch zu ermitteln, ist nach unseren Untersuchungen nicht möglich. Faktoren, wie die gegenseitige Beeinflussung verschiedener Keime in einem Keimgemisch, der Gehalt an unterschiedlichen Nährstoffen in den einzelnen Eissorten sowie der ph-Wert und dessen Veränderungen während der Speiseeislagerung, spielen dabei ebenfalls eine bedeutende Rolle.

Im Zusammenhang mit der Forderung nach der Gleichzeitigkeit der Untersuchung von Probe und Gegenprobe sei nochmals darauf hingewiesen, daß natürlich auch die gleiche Methode der Speiseeisuntersuchung verwendet werden sollte. Sonst sind die Ergebnisse nicht vergleichbar, wie schon B o e s e (5) 1953 feststellte.

4. Zusammenfassung

Nachdem eingangs die Methoden der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung anderer Autoren besprochen werden, wird eine eigene Methode geschildert, die die Forderung nach Einfachheit mit jener nach genügender Sicherheit und Zuverlässigkeit verbindet.

Der Indolnachweis zur Feststellung des Colititers sowie die Membranfiltermethode zur Erhebung der Colizahl werden experimentell auf ihre Brauchbarkeit bei der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung geprüft. Es wird an Hand der Versuchsergebnisse nachgewiesen, daß diese Methoden sich nicht für die bakteriologische Speiseeisüberwachung eignen.

Ferner wird das Verhalten verschiedener Bakterienarten und -Zahlen im Speiseeis bei unterschiedlicher Lagerungstemperatur und -Zeit zur Beurteilung der Aussagekraft von Gegenproben bei der bakteriologischen Speiseeisüberwachung experimentell untersucht. Auf Grund der Versuchsergebnisse wird die Forderung erhoben, daß eine Gegenprobe bei der bakteriologischen Speiseeisuntersuchung nur gleichzeitig mit der Probe und mit der gleichen Methode untersucht werden darf, da andernfalls das Ergebnis dieser Zweituntersuchung nicht zur Kontrolle der Befunde der Erstuntersuchung verwertbar ist.

5. Literatur

1. Adler, F. — Speiseeisüberwachung durch das Gesundheitsamt. Desinfektion u. Gesundheitswesen 50, 4, 53 (1958)

2. American Public Health Assoc. — Standard methods for the examination of dairy products. 1953 10 th ed American Public Health Assoc. Inc., New York, N.Y.

3. Barnes, E.M. — Tetrazolium reduction as a means of differentiating Streptococcus faecalis from Streptococcus faecium. J.Gen.Microbiol., 14, 57-68

4. Bauer, W. — Zur Hygiene des Speiseeises. Öff.Gesundheitsdienst 23, 10, 478 (1961)

5. Boese, W. — Bakteriologische Speiseeisuntersuchungen und ihre Ergebnisse. Z.Hyg.137, 286-289 (1953)

6. Borgmann, W. — Aufgaben der Medizinaluntersuchungsämter bei der Durchführung des Bundes-Seuchengesetzes und des Lebensmittelgesetzes aus der Sicht der Gesundheitsverwaltung. Bundesgesundheitsblatt, 7.Jahrg., Nr.24, 27.Nov.1964

7. Borgstrom, G. — Microbiological problems of frozen food products. Advances in Food Research, 6, 163-230

8. Borneff, J. — Vorschläge zur bakteriologischen Untersuchung von Speiseeis. Arch.Hyg.136, 5 (1952)

9. Borneff, J. — Über die Entstehung von Keim- und Colizahl im Speiseeis. Arch.Hyg.136, 97 (1952)

10. Borneff, J. — Methoden und Ziele der Colitestung. Arch.Hyg.141, 505 (1957)

11. Borneff, J. — Die Bewertung von Speiseeisbakterien nach Art und Zahl. Süßwaren 7, 172 (1963)

12. Calcanis, A. — Bakteriologische Befunde bei der Speiseeis-Untersuchung im Sommer 1961 in Düsseldorf. Gesundheitswesen und Desinfektion 54, 8, 114 (1962)

13. Deibel, R.H. and Silliker, I.H. — Food-poisoning potential of the enterococci. J.Bact.85, 827-832 (1963)

14. Fritsch — Speiseeis-Erzeugung: Zur Frage der Herstellung, der Überwachung und des Vertriebes von Speiseeis und ähnlichen Erzeugnissen. Desinfektion u. Gesundheitswesen 49, 88 (1957)

15. Hallmann — Bakteriologie und Serologie. Stuttgart, 1961

16. Hartman, P.A. and Huntsberger, D.V. — Influence of subtile differences in plating procedure on bacterial counts of prepared frozen foods. Appl.Microbiol.9, 32-38 (1961)

17. Hoch, V. und Nikodemusz, J. — Untersuchungen zum Nachweis von pathogenen Darmbakterien in Lebensmitteln. Jahrbuch des Instituts f.Ernährungs- u.Verpflegungswissenschaft, 1962, S.43, Budapest

18. Jones, A.H. and Ferguson, W.E. — A study of methods of preparing food products for microbiological analysis. Food Research, 16, 126-132 (1951)

19. Konferenzbericht — Microbiological standards for foods. Publ.Health Rep.75, 815-822 (1960)

20. Koschucharoff, B. und Stawreff, I. — Eine durch Speiseeis hervorgerufene Flexner-Ruhr-Epidemie. Zbl.Bakt., J.Abt.Orig.194, 193 (1964)

21. Leopold, P.G. und Förster, E. — Typhusinfektionen durch Speiseeis 1956. Z.inn.Me.12, 349-359 (1957)

22. Maximos, A. — Bakteriologische Untersuchungsergebnisse von industriell und handwerklich hergestelltem Speiseeis (Sommer 1963). Arch.Hyg.148, 527 (1964)

23. Messerschmidt, Th. — Zur Frage des "Peptons" im bakteriologischen Nährboden. Arch.Hyg.136, 113 (1952)

24. Mülhens, K. — Reinigung als praktisch hygienische Entkeimung in Nahrungsmittelbetrieben. Desinfektions- und Ges.Wesen 58, 84 (1966)

25. Münchow, S. — Hygienische Aspekte der Automatenverpflegung. Arch.Hyg.149, 431 (1965)

26. Muschter, W. — Enteritis Infektiosa durch Speiseeis. Z.ges.Hyg.8, 870 bis 873 (1962)

27. Nutting, L.A., Lomot, P.C. and Barber, F.W. — Estimation of coliform bacteria in icecream by use of the membrane filter. Appl.Microbiol.7, 196-199 (1959)

28. Ramadan, F.M. — Comparative studies on the detection of pollution of wter, milk, and ice cream. Appl.Microbiol.8, 199-204 (1960)

29. Roemmle, O. und Danneel, M. — Die hygienisch-bakteriologische Untersuchung von Trinkmilch, Milcherzeugnissen, Trockenkindermilch und Speiseeis. Arch.Lebensmitt.-Hyg.15, 1-3 (1964)

30. Schumann, F. — Die technische Kontrolle in den Speiseeisbetrieben vom hygienischen Standpunkt aus. Gesundh.-Wesen u.Desinfek.56, 4, 60 (1964)

31. Seidel, G., Janeck, K. und Hoffmann, G. — Über eine nach Genuß von Speiseeis aufgetretene durch Staphylococcus aureus verursachte Intoxikation. Mh.Vet.-Med.17, 782-786 (1962)

32. Selenka, F. — Die hygienisch-bakteriologische Beschaffenheit von Softeis, Einfluß der Gerätekonstruktion. Milchwiss.22, 1, 16-20 (1967)

33. Straka, R.P. and Stokes, J.L. — Rapid destruction of bacteria in commonly used diluents and its elimination. Appl.Microbiol., 5, 21-25 (1957)

34. Winkler, A. Über eine durch Speiseeisgenuß hervorgerufene Massenerkrankung. Gesundheitswesen u. Desinfektion 56, 10, 143 (1964)

Danksagung

Für die Überlassung des Themas und die Unterstützung und freundliche Beratung bei der Fertigstellung dieser Arbeit danke ich

Herrn Chefarzt Priv.Doz.Dr.med. M.Kienholz

ganz besonders.

Lebenslauf

Am 26.10.1938 wurde ich, Georg Reinhart Flux, als Sohn des Arztes Dr.med. Kurt Flux und seiner Ehefrau Dr.med. Maria Flux, geb. Reinmuth, in Dresden geboren.

Ich besuchte die Grundschule in Mügeln, die Oberschule in Oschatz, die Sprachenschule Siegerland sowie das Gymnasium in Wuppertal.

1960 begann ich das Medizinstudium in Mainz, setzte es nach dem Vorphysikum in Freiburg fort und hörte klinische Vorlesungen in Hamburg und Gießen, wo ich 1966 das Staatsexamen ablegte.

Als Medizinalassistent arbeitete ich an der Univ.Hautklinik in Gießen, am Stadtkrankenhaus Offenbach, am U.M.T. Sanatorium in Madanapalle, Südindien, am Kreiskrankenhaus Rotenburg/Fulda, an der Univ.Frauenklinik in Gießen, an der II.Med.Klinik in Frankfurt und erneut am U.M.T.Sanatorium, Madanapalle. Nach meiner Approbation bin ich seit Mai 1969 an der Univ.Augenklinik Tübingen tätig.

Druckbüro Frau Elly HUTH, 74 Tübingen